



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61L 31/00, 27/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 96/33751</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 31 octobre 1996 (31.10.96)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00636 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 25 avril 1996 (25.04.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/05181 25 avril 1995 (25.04.95) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> W.K. ET ASSOCIES [FR/FR]; 76, avenue de Saint-Mandé, F-75012 Paris (FR). <b>(71)(72) Déposant et inventeur:</b> DEBACKER, Yves [FR/FR]; 13, gravier du Robinet, F-59117 Wervicq (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> VILLAIN, Franck [FR/FR]; 43, rue Sommeiller, F-74000 Annecy (FR). JALLET, Valérie [FR/FR]; 14, rue de l'Isemon, F-74000 Annecy (FR). <b>(74) Mandataires:</b> LE ROUX, Martine etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, BR, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> INJECTABLE HYALURONIC ACID-CONTAINING DUAL-PHASE COMPOSITIONS, PARTICULARLY USEFUL IN CORRECTIVE AND PLASTIC SURGERY <b>(54) Titre:</b> COMPOSITIONS BIPHASIQUES INJECTABLES RENFERMANT DE L'ACIDE HYALURONIQUE, NOTAMMENT UTILES EN CHIRURGIES REPARATRICE ET ESTHETIQUE <b>(57) Abstract</b> <p>Dual-phase compositions containing a polymer selected from hyaluronic acid and its salts, method for preparing the compositions, and filler material useful in corrective and plastic surgery based on said dual-phase compositions. The compositions comprise an injectable suspension with a dispersed phase composed of insoluble fragments of a hydrogel of said strongly cross-linked polymer and a continuous phase composed of an aqueous solution of said polymer and/or another biocompatible polymer, selected from proteins, polysaccharides and derivatives thereof, non cross-linked or weakly cross-linked.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention a pour objets: des compositions biphasiques renfermant un polymère choisi parmi l'acide hyaluronique et ses sels, un procédé de préparation desdites compositions, un matériau de comblement, utile en chirurgie réparatrice et en chirurgie esthétique, à base desdites compositions biphasiques. Lesdites compositions consistent en une suspension injectable dont la phase dispersée est constituée de fragments insolubles d'un hydrogel dudit polymère fortement réticulé et dont la phase continue est constituée d'une solution aqueuse dudit polymère et/ou d'un autre polymère biocompatible, choisi parmi les protéines, les polysaccharides et leurs dérivés, faiblement ou pas réticulé(s).</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine			SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SG	Singapour
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LR	Libéria	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LT	Lituanie	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	UG	Ouganda
FI	Finlande	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon	MR	Mauritanie	VN	Viet Nam

Compositions biphasiques injectables renfermant de l'acide hyaluronique, notamment utiles en chirurgies réparatrice et esthétique.

La présente invention a pour objets :

- des compositions biphasiques renfermant un polymère choisi parmi  
5 l'acide hyaluronique et ses sels,
- un procédé de préparation desdites compositions,
- un matériau de comblement, utile en chirurgie réparatrice et en chirurgie esthétique, à base desdites compositions biphasiques.

La présente invention propose notamment une solutions satisfaisante au  
10 problème technique du comblement durable des défauts de volume de la peau, tels les rides ou cicatrices, notamment au niveau du visage. Elle propose plus généralement une formulation originale à base d'acide hyaluronique.

Ledit acide hyaluronique est un glycosaminoglycane ou mucopolysaccharide de poids moléculaire élevé que l'on trouve dans les tissus  
15 animaux tels que les cordons ombilicaux, l'humeur vitrée, le liquide synovial, les crêtes de coq, la peau, les tissus connectifs (articulations, tendons ...) ... Ledit acide peut ainsi être obtenu naturellement par extraction à partir de certains desdits tissus animaux (des crêtes de coq et cordons ombilicaux notamment). Il peut également être obtenu par fermentation bactérienne.

La structure chimique dudit acide est celle d'un polymère présentant des  
20 monomères disaccharidiques de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide-D-glucoronique, ladite amine et ledit acide étant reliés par une liaison glucosidique  $\beta 1 \rightarrow 3$ . Les monomères disaccharidiques sont eux reliés entre eux par des liaisons glucosidiques  $\beta 1 \rightarrow 4$  pour générer la chaîne polysaccharidique non réticulée, sans  
25 embranchement.

Ladite chaîne présente toutefois, au niveau de ses monomères, des fonctions qui permettent de la réticuler chimiquement afin de créer un réseau plus ou moins dense.

On sait, d'une manière générale, que toute molécule est beaucoup plus  
30 résistante à la dégradation et à la chaleur lorsqu'elle est réticulée. Ainsi l'intérêt de réticuler l'acide hyaluronique réticulé est-il connu. Ledit acide hyaluronique réticulé est beaucoup plus stable dans l'organisme que la molécule d'acide hyaluronique. Il résiste également mieux à une stérilisation à l'autoclave.

L'acide hyaluronique est connu pour ses propriétés viscoélastiques ainsi  
35 que sa très grande propension à absorber l'eau. Ses propriétés expliquent en grande partie l'élasticité de la peau. Ses biocompatibilité, tolérance et toxicité ont été

largement étudiées dans la mesure où depuis plus de 10 ans, cette molécule à des applications dans les domaines médicaux et cosmétiques. Il est notamment connu de l'utiliser en chirurgie ophtalmologique, pour soigner l'ostéoarthrite, pour soigner les grands brûlés.

5           Selon l'art antérieur, on a donc déjà décrit de nombreuses compositions, de différents types, renfermant de l'acide hyaluronique. On a notamment décrit :

- dans le brevet US-A-5,137,875 : des solutions ou dispersions injectables de collagène renfermant de l'acide hyaluronique en solution ainsi que leur utilisation pour combler des vides dans les tissus mous;
- 10           - dans le brevet US-A-4,716,154 : un gel d'acide hyaluronique réticulé, substitut de l'humeur vitrée;
- dans la demande EP-A-0 466 300 : un gel viscoélastique comprenant une phase gélatineuse (ayant subi une réticulation de faible taux) dispersée dans une phase liquide (n'ayant pas subi de réticulation) ; lesdites deux phases ayant
- 15           avantageusement été préparées à partir de fibres de Hylan (acide hyaluronique naturel modifié chimiquement in situ dans le but de faciliter son extraction des tissus) . On préconise d'utiliser lesdites compositions dans de nombreux contextes du domaine médical.

20           Selon le premier objet de l'invention, comme précisé ci-dessus, on propose des compositions biphasiques qui renferment de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels (dit le polymère) et qui présentent une structure originale . Lesdites compositions consistent en une suspension injectable dont la phase dispersée est constituée de fragments insolubles d'un hydrogel dudit polymère fortement réticulé et dont la phase continue est constituée d'une solution aqueuse dudit polymère

25           et/ou d'un autre polymère biocompatible, choisi parmi les protéines, les polysaccharides et leurs dérivés, faiblement ou pas réticulé(s).

          On emploie dans la suite du présent texte le terme acide hyaluronique comme nom générique pour désigner aussi bien l'acide hyaluronique per se que ses sels et notamment les sels de hyaluronate . Les compositions biphasiques de

30           l'invention renferment avantageusement à titre de polymère choisi parmi l'acide hyaluronique et ses sels, au moins dans leur phase dispersée, du hyaluronate de sodium. On précise déjà que ledit hyaluronate de sodium intervenant est avantageusement d'origine bactérienne.

          Les compositions biphasiques de l'invention sont des compositions

35           injectables. Elles ont été formulées dans cette optique. C'est notamment à cette fin

qu'elles renferment une phase continue; ladite phase servant de véhicule d'injection aux fragments de la phase dispersée.

Le qualificatif injectable, employé dans le présent texte, signifie injectable manuellement au moyen de seringues munies d'aiguilles classiques. Les compositions biphasiques de l'invention sont particulièrement intéressantes en ce qu'elles peuvent être formulées pour être injectables au moyen d'aiguilles très fines (d'un diamètre compris entre 0,3 et 0,5 mm). L'homme du métier comprend que le paramètre déterminant est celui de la plus grande dimension des fragments en suspension. Dans le cadre de la présente invention, il est notamment possible de formuler des compositions, renfermant de l'acide hyaluronique, injectables au travers d'aiguilles hypodermiques de 30 G, 26 G1/2, 25 G. Lesdites compositions constituent la variante la plus avantageuse des compositions de l'invention.

On développe ci-après les caractéristiques principales de chacune des phases des compositions biphasiques de l'invention.

La phase continue qui, comme déjà précisé ci-dessus, sert de véhicule d'injection est constituée d'une solution aqueuse qui, de façon caractéristique, renferme de l'acide hyaluronique (ou l'un de ses sels) et/ou un autre polymère biocompatible choisi parmi les protéines, les polysaccharides et leurs dérivés. Ledit acide hyaluronique et/ou l'autre polymère intervient non réticulé ou faiblement réticulé (par l'intermédiaire d'un agent réticulant). Il convient que la viscosité de ladite phase continue demeure compatible avec sa fonction de véhicule d'injection. On note que ladite phase continue assure par ailleurs une autre fonction. Après injection et implantation de la composition biphasique, elle protège la phase dispersée, elle en ralentit la dégradation.

Ladite phase continue peut notamment exister sous la forme d'une solution ou sous celle d'un gel.

Il n'est pas exclu du cadre de la présente invention que ladite phase continue renferme un mélange de polymères.

Selon une variante avantageuse de l'invention, elle renferme le même polymère que la phase dispersée, à savoir l'acide hyaluronique; ledit acide hyaluronique intervenant toutefois, au sein de ladite phase continue à un taux de réticulation bien moindre, voire nullement réticulé. L'intervention de l'acide hyaluronique dans les deux phases est largement préférée au vu des propriétés avantageuses de ce produit qui peut notamment être obtenu par voie bactérienne, par voie cellulaire (donc exempt de tout contaminant du type virus ou prion) et qui

présente à la fois un fort caractère gélatineux, un pouvoir lubrifiant appréciable, une bonne biocompatibilité ainsi qu'une bonne tenue dans l'organisme.

Les autres polymères susceptibles d'intervenir dans la phase continue des compositions de l'invention sont, comme indiqué ci-dessus, des protéines ou des polysaccharides et leurs dérivés. On citera, à titre nullement limitatif, parmi les protéines dont on préconise l'intervention : le collagène, l'albumine, l'élastine ...  
parmi les polysaccharides et leurs dérivés, dont on préconise également l'intervention (autres que l'acide hyaluronique) : les sulfates de chondroïtine, de kératan, l'héparine, l'acide alginique, l'amidon, la carboxyméthylcellulose ...

Ladite phase continue renferme en son sein, de façon caractéristique, des fragments insolubles d'un hydrogel d'acide hyaluronique fortement réticulé. Ces fragments insolubles (de géométrie variable) constituent de réelles entités qui sont séparables de la phase continue diluée par décantation ou centrifugation. Au sein desdits fragments, l'acide hyaluronique est fortement réticulé : un réseau d'une relative densité a été constitué à partir des chaînes d'acide hyaluronique et d'un agent réticulant. Ceci est expliqué, quantifié, plus avant dans le présent texte.

L'intervention de ce type de fragments (ou particules) renfermant de l'acide hyaluronique, à titre de phase dispersée dans une phase continue telle que décrite ci-dessus confère aux compositions biphasiques de l'invention leur structure originale. Elle fait notamment desdites compositions, des précurseurs de matériaux de comblement ou implants durables, utiles en chirurgie réparatrice et en chirurgie esthétique, originaux et particulièrement performants.

Les compositions biphasiques injectables de l'invention sont tout particulièrement destinées à une injection dermique (superficielle, moyenne ou profonde) pour une implantation dans le derme. A cet effet, dans le but d'éliminer toute sensation désagréable voire toute douleur au cours de leur injection et pendant leur implantation, elles sont avantageusement tamponnées à un pH compris entre 6,5 et 7,5, de préférence compris entre 7 et 7,4, de façon encore plus préférée entre 7,2 et 7,3.

Ainsi, la solution aqueuse (phase continue) d'une part et l'hydrogel (phase dispersée) d'autre part, sont-ils avantageusement tamponnés à ces pH.

On met généralement en oeuvre un tampon phosphate.

On précise ci-après des caractéristiques avantageuses des fragments constituant la phase dispersée des compositions biphasiques de l'invention.

Lesdits fragments peuvent intervenir au sein desdites compositions, à l'équilibre, sous ou sur-hydratés. Lorsqu'ils sont injectés, sous ou sur-hydratés, ils se mettent à l'équilibre, après implantation. En tout état de cause, ils interviennent dans des dimensions (et en une quantité) compatibles avec les moyens prévus pour leur injection. Avantageusement, plus de la moitié desdits fragments ont leur plus grande dimension comprise entre 40 et 280  $\mu\text{m}$ , de préférence comprise entre 75 et 250  $\mu\text{m}$ . De façon encore plus avantageuse, la quasi-totalité desdits fragments présente cette caractéristique là. On a alors affaire à des compositions injectables au moyen d'aiguilles fines, d'un diamètre compris entre 0,3 et 0,5 mm.

On parle de la plus grande dimension desdits fragments, on pourrait également parler de leur diamètre équivalent. Les fragments insolubles d'hydrogel des compositions biphasiques de l'invention, sont obtenus, comme cela sera précisé plus loin dans le présent texte, par cisaillement d'une masse et ne consistent donc généralement pas en des sphères.

L'hydrogel constitutif desdits fragments a été obtenu à partir d'acide hyaluronique fortement réticulé par l'intermédiaire d'un agent réticulant. On préconise, pour l'obtention de fragments renfermant une quantité raisonnable dudit agent réticulant, d'utiliser comme matériau de départ un acide hyaluronique dont la masse moléculaire est supérieure ou égale à 1 million de Daltons. Selon une variante avantageuse, on préconise d'utiliser un acide hyaluronique dont la masse moléculaire est comprise entre 1 et 3 millions de Daltons. On préconise par ailleurs de mettre en oeuvre ladite réticulation, via les fonctions hydroxyles de l'acide hyaluronique, au moyen d'un agent réticulant, dans des conditions qui conduisent à un taux de réticulation dudit acide hyaluronique (matériau de départ) caractérisé par le rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules d'acide hyaluronique présentes compris entre 0,8 et 1.

En fait, le réseau des fragments insolubles des compositions biphasiques de l'invention est à base de molécules d'acide hyaluronique reliées par des ponts de molécules d'agent réticulant; chacun des motifs disaccharidiques desdites molécules d'acide hyaluronique ayant avantagement entre 0,8 et 1 de ses fonctions hydroxyles engagée dans de tels ponts.

La plage indiquée pour ledit taux de réticulation est une plage optimale. Il n'est pas exclu de faire intervenir dans des compositions de l'invention des fragments présentant un tel taux de réticulation en deçà de la valeur 0,8 (on veillera toutefois à conserver auxdits fragments leur propriétés intrinsèques d'insolubilité)

ou au-delà de la valeur 1 (on veillera alors à ne pas trop altérer la nature des fragments à base d'acide hyaluronique qui contiendront de plus en plus d'agent réticulant).

A titre d'agent réticulant, on peut faire intervenir, pour générer l'hydrogel  
5 constitutif des fragments insolubles des compositions biphasiques de l'invention, tout agent connu pour réticuler l'acide hyaluronique par l'intermédiaire de ses fonctions hydroxyles – agent réticulant au moins bifonctionnel – et notamment un polyépoxyde ou ses dérivés. A titre de tel agent réticulant, on peut notamment faire  
10 intervenir l'épichlorhydrine, le divinylsulfone, le 1,4-bis(2,3-époxypropoxy)butane (ou 1,4-bis(glycidyloxy)butane ou encore 1,4-butanediol diglycidyl ether = BDDE), le 1,2-bis(2,3-époxypropoxy)éthylène, le 1-(2,3-époxypropyl)-2,3-époxy cyclohexane ... Il n'est pas exclu du cadre de l'invention de faire intervenir plusieurs agents réticulants ...

On peut par ailleurs caractériser les fragments insolubles d'hydrogel des  
15 compositions de l'invention par d'autres paramètres, tels leur teneur en matière sèche ou leurs propriétés optiques.

La teneur en matière sèche desdits fragments a été mesurée dans le cadre de l'invention, avec lesdits fragments tamponnés (à un pH compris entre 6,5 et 7,5), à l'équilibre. Dans ces conditions, lesdits fragments de l'invention présentent  
20 avantageusement un taux de matière sèche compris entre 1,5 et 20 %, encore plus avantageusement entre 5 et 15 %.

Lesdits fragments, dans les mêmes conditions, transmettent moins de 5 % de la lumière à 400 nm.

Les compositions biphasiques de l'invention renferment généralement de  
25 10 à 200 mg/ml, avantageusement de 20 à 150 mg/ml, desdits fragments insolubles en suspension dans leur phase continue. En introduisant une trop grande quantité de phase dispersée dans ladite phase continue, on peut compromettre le caractère injectable desdites compositions. En introduisant une trop faible quantité de ladite phase dispersée dans ladite phase continue, on peut diminuer fortement l'intérêt  
30 desdites compositions. Elles ont en effet été conçues pour autoriser la mise en place par injection d'une quantité efficace d'acide hyaluronique fortement réticulé (donc résistant aux dégradations). Il convient en fait d'optimiser le rapport : masse active transportée / masse de véhicule d'injection ...

On précise ci-après des caractéristiques avantageuses de la solution  
35 aqueuse constituant la phase continue des compositions biphasiques de l'invention.



Ladite phase continue renferme de l'acide hyaluronique et/ou un autre polymère biocompatible, faiblement ou pas réticulé.

Ladite phase continue peut être caractérisée par sa viscosité intrinsèque  $[\eta]$ . Ce paramètre est donné par la formule :

$$5 \quad [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$$

dans laquelle  $\eta_0$  est la viscosité du solvant,

$\eta$  la viscosité mesurée de la solution,

$c$  la concentration de ladite solution.

10 Ladite phase continue des compositions biphasiques de l'invention a avantageusement sa viscosité intrinsèque comprise entre 1 500 et 3 200 ml/g. De préférence encore la viscosité intrinsèque est comprise entre 2 000 et 2 700 ml/g.

Ladite viscosité intrinsèque de ladite phase continue dépend évidemment de la nature du polymère intervenant, de sa concentration et de son taux de réticulation.

15 Ladite viscosité est à optimiser, dans le cadre d'un compromis, dans la mesure où l'on souhaite que ladite phase continue constitue le véhicule d'injection des fragments insolubles, d'une part et ralentisse la dégradation desdits fragments implantés, d'autre part.

20 D'une manière générale, on peut parler d'une optimisation au niveau de la composition de ladite phase continue; les paramètres disponibles étant la nature du (des) polymère(s) intervenant(s), la concentration du(des)dit(s) polymère(s), et éventuellement le taux de réticulation du(des)dit(s) polymère(s).

25 Quelle que soit la nature dudit polymère intervenant dans la phase continue, l'homme du métier sait maîtriser sa réticulation, lorsque celle-ci est possible.

On a vu que selon une variante avantageuse de l'invention, l'acide hyaluronique intervient aussi au niveau de ladite phase continue. Ledit acide hyaluronique peut intervenir ici non réticulé ou faiblement réticulé. On préconise ici aussi de faire intervenir un acide hyaluronique dont la masse moléculaire est 30 supérieure ou égale à 1 million de Daltons et encore plus avantageusement un acide hyaluronique dont la masse moléculaire est comprise entre 1 et 3 millions de Daltons. Lorsque ledit acide hyaluronique est faiblement réticulé, on préconise de mettre en oeuvre ladite réticulation, via ses fonctions hydroxyles, au moyen d'un agent réticulant, dans des conditions qui conduisent à un taux de réticulation dudit 35 acide hyaluronique caractérisé par le rapport : nombre total de fonctions réactives

dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules de l'acide hyaluronique présentes, compris entre 0,01 et 0,4. On constate que ledit taux de réticulation pour l'acide hyaluronique intervenant dans la phase continue est généralement toujours inférieur à la moitié de celui de l'acide hyaluronique intervenant dans la phase dispersée.

La réticulation est généralement mise en oeuvre lors de la préparation de la phase continue de la même manière qu'elle est mise en oeuvre lors de la préparation de la phase dispersée; lorsque l'acide hyaluronique intervient dans lesdites deux phases.

Ainsi ladite réticulation de la phase continue fait-elle aussi avantageusement intervenir à titre d'agent réticulant un polyépoxyde et notamment le 1,4-bis(2,3-époxypropoxy)butane.

On retrouve, dans cette hypothèse, ledit polyépoxyde accroché par des ponts éthers aux motifs disaccharidiques des chaînes de l'acide hyaluronique, présentes dans les phases continue et dispersée.

Ledit acide hyaluronique, présent dans la phase dispersée des compositions biphasiques de l'invention, voire, avantageusement dans les deux phases dispersée et continue desdites compositions (à l'exclusion de tout autre polymère selon une variante particulièrement préférée) est de préférence un acide hyaluronique qui a été obtenu par voie bactérienne.

Selon la variante préférée de l'invention, on propose une suspension injectable telle que définie ci-dessus renfermant de l'acide hyaluronique, obtenu par fermentation bactérienne, dans ses deux phases. Par le biais d'une telle suspension hautement biocompatible, on injecte des fragments insolubles avec une grande facilité et lesdits fragments sont particulièrement résistants à la dégradation, une fois implantés, de par leur structure intrinsèque et de par le fait qu'ils sont protégés par la phase continue avec laquelle ils ont été injectés.

Selon le second objet de la présente invention, on propose un procédé de préparation des compositions biphasiques décrites ci-dessus. Ledit procédé comprend, de façon caractéristique :

- la préparation et la purification d'un hydrogel insoluble d'acide hyaluronique fortement réticulé;
- la fragmentation dudit hydrogel par cisaillement;
- la mise en suspension des fragments dudit hydrogel cisailé dans une phase continue adéquate.

Au cours de la première des étapes ci-dessus, il convient de préparer un hydrogel d'acide hyaluronique fortement réticulé. A cette fin, on met généralement en solution la matière première utilisée (souvent des fibres de hyaluronate de sodium) et l'on fait réagir sur celle-ci un agent réticulant adéquat en des proportions adéquates. On utilise avantageusement comme matériau de départ un  
5 acide hyaluronique dont la masse moléculaire est supérieure ou égale à un million de Daltons, de préférence comprise entre 1 et 3 millions de Daltons, et on le réticule de sorte que le rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules de l'acide  
10 hyaluronique présentes, soit compris entre 0,8 et 1. A l'issue de la réaction de réticulation, on purifie le mélange réactionnel pour en éliminer les réactifs qui n'ont pas réagi. Cette purification peut être mise en oeuvre par extraction à l'eau déionisée dans un soxhlet. L'hydrogel purifié obtenu est alors fragmenté par cisaillement. Un tel cisaillement génère des fragments de géométrie et de taille  
15 non uniformes. L'homme du métier saura optimiser sa mise en oeuvre pour l'obtention des fragments adéquats.

Lesdits fragments sont ensuite mis en suspension dans la phase continue préparée préalablement ou parallèlement.

Ladite phase continue est préparée d'une manière analogue si une  
20 réticulation doit être mise en oeuvre. Avantageusement, ladite phase continue est préparée à partir d'un acide hyaluronique dont la masse moléculaire est supérieure ou égale à 1 millions de Daltons, de préférence compris entre 1 et 3 millions de Daltons, et ledit acide hyaluronique est réticulé de sorte que le rapport : nombre total de fonctions réactives de l'agent réticulant / nombre total de motifs  
25 disaccharidiques des molécules de l'acide hyaluronique présentes, soit compris entre 0,01 et 0,4. Dans la mesure où une telle réticulation est mise en oeuvre à un degré moindre, la purification du produit réticulé doit généralement se faire selon d'autres techniques que l'extraction. On peut notamment procéder par cycles de solubilisation / précipitation successifs voire par dialyse.

30 Si aucune réticulation n'est mise en oeuvre, la phase continue est préparée par simple mélange de la matière première dans une solution aqueuse.

Les phases obtenues à l'issue de leur procédé de préparation sont plus au moins hydratées.

Pour leur mélange, pour la mise en suspension des fragments d'hydrogel  
35 dans la phase continue, on peut notamment procéder selon l'une ou l'autre des variantes ci-dessous, nullement exhaustives :

- on peut notamment mélanger les fragments convenablement hydratés dans une phase continue élaborée au taux d'hydratation souhaitée,
- on peut également mélanger lesdits fragments secs ainsi qu'un produit sec précurseur de la phase continue et hydrater convenablement ledit mélange sec,
- 5       - on peut également prévoir de mélanger les deux phases, l'une à l'état sec, l'autre à l'état hydraté et d'ajuster si nécessaire le taux d'hydratation du mélange.

La première desdites variantes est préférée.

Les compositions de l'invention ainsi préparées peuvent être  
10 conditionnées, notamment dans des seringues, puis stérilisées, en autoclave par exemple.

On a vu plus haut dans le présent texte que l'on préconise leur injection dans la peau à titre de matériau de comblement, plus précisément à titre de précurseur d'un tel matériau de comblement, qui inscrit son efficacité dans la  
15 durée.

Selon son dernier objet, l'invention concerne donc un matériau de comblement utile en chirurgie réparatrice et en chirurgie esthétique, à base des compositions biphasiques telles que décrites ci-dessus.

Ledit matériau, de façon caractéristique, présente une structure qui, après  
20 injection et implantation de celui-ci dans le derme, évolue.

Suite à la résorption de la phase continue (prévue pour protéger la phase dispersée), les fragments de la phase dispersée se regroupent pour générer un film stable. Ledit film est une structure tout-à-fait originale.

On préconise l'utilisation d'un tel matériau de comblement pour combler  
25 notamment les rides du visage telles la ride glabellaire, les rides péri-buccales, les sillons naso-géniens, pour atténuer les pattes d'oie ...

L'invention est illustrée par les exemples ci-après.

#### 30       Exemple 1

On prépare une composition biphasique de l'invention à partir d'un unique polymère : des fibres de l'hyaluronate de sodium (de masse moléculaire :  $M_w = 2.10^6$ ), d'origine bactérienne.

Deux solutions, à 11,8 % en masse desdites fibres, dans de la soude  
35 0,25 M sont tout d'abord préparées.

. 430  $\mu$ l de 1,4-bis(2,3-époxypropoxy)butane (butanediol diglycidyl éther : BDDE) sont ajoutés à l'une desdites solutions. Le mélange, homogénéisé, est mis au bain-marie, à 50°C, pendant 2 heures. L'hydrogel obtenu est un solide. Il est purifié (par extraction à l'eau déionisée dans un soxhlet) afin d'éliminer de sa structure à la fois l'agent réticulant (BDDE) et le polymère qui n'ont pas réagi. Au sein d'un tel hydrogel, le rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules du polymère présentes est de 0,84. A l'équilibre dans du tampon phosphate, ledit hydrogel - fortement réticulé - renferme 9,7 % en masse, de matière sèche. Dans cet état, il transmet moins de 5 % de la lumière à 400 nm.

Ledit hydrogel purifié est alors cisaillé pour en obtenir des fragments solides d'une taille moyenne compris entre 75 et 250  $\mu$ m. Lesdits fragments sont mis en suspension dans un tampon phosphate à pH 7,2, à raison de 6 g pour 100ml de tampon phosphate.

. Parallèlement, 31  $\mu$ l de 1,4-bis(2,3-époxypropoxy)butane (butanediol diglycidyl éther : BDDE) sont ajoutés à l'autre desdites solutions. Le mélange, homogénéisé, est également mis au bain-marie, à 50°C, pendant 2 heures. A l'issue de ce chauffage, on obtient un fluide très visqueux qui doit lui aussi être purifié. Au sein de ce fluide visqueux, le rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules du polymère présentes, est de 0,12. A partir dudit fluide, on prépare la phase continue de la composition biphasique souhaitée. Ledit fluide est en fait purifié par solubilisation / précipitation. A l'issue d'une telle purification, le précipité est séché puis ré-hydraté avec un tampon phosphate à pH 7,2, à raison de 6 g dudit précipité pour 100 ml dudit tampon.

. On mélange, alors, dans des proportions de 1/1 la suspension renfermant les fragments et la solution aqueuse visqueuse. On obtient une suspension injectable, notamment au travers d'aiguilles de 26 G 1/2 à 30 G.

## Exemple 2

On procède, de manière générale, comme à l'exemple 1, sauf que :

1) pour la préparation de la phase dispersée, on fait intervenir seulement 250  $\mu$ l de BDDE;

2) pour la préparation de la phase continue, on met directement les fibres d'acide hyaluronique en solution dans le tampon phosphate à pH 7,2 (on ne met pas en oeuvre de réticulation);

3) lors du mélange final, phase dispersée / phase continue, on fait intervenir lesdites deux phases dans un rapport 2/1.

De telles suspensions (préparées selon l'exemple 1 et l'exemple 2) ont été  
5 injectées pour combler des rides du visage chez 10 volontaires. On a, en fait,  
injecté moins d'un millilitre de telles suspensions à chaque fois. Le produit, injecté  
dans le derme moyen ou profond, n'a provoqué aucune réaction indésirable,  
notamment pas de réaction inflammatoire, ni de rougeur, ni douleur. Après trois  
10 mois, l'implant est toujours présent et réalise un comblement efficace du défaut  
cutané traité. Les suspensions – compositions biphasiques – de l'invention sont  
efficaces pour traiter de manière durable les dépressions cutanées.

- Revendications -

1. Composition biphasique renfermant un polymère choisi parmi l'acide hyaluronique et ses sels, caractérisée en ce qu'elle consiste en une suspension injectable dont la phase dispersée est constituée de fragments insolubles d'un hydrogel dudit polymère fortement réticulé et dont la phase continue est constituée d'une solution aqueuse dudit polymère et/ou d'un autre polymère biocompatible, choisi parmi les protéines, les polysaccharides et leurs dérivés, faiblement ou pas réticulé(s).
2. Composition biphasique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite suspension est tamponnée à un pH compris entre 6,5 à 7,5.
3. Composition biphasique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que plus de la moitié desdits fragments ont leur plus grande dimension comprise entre 40 et 280  $\mu\text{m}$  et avantageusement entre 75 et 250  $\mu\text{m}$ .
4. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'hydrogel constitutif desdits fragments est obtenu à partir dudit polymère dont la masse moléculaire est supérieure ou égale à 1 million de Daltons, avantageusement comprise entre 1 et 3 millions de Daltons et qui a été réticulé, via les fonctions hydroxyles dudit polymère, au moyen d'un agent réticulant, dans un rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules du polymère présentes, compris entre 0,8 et 1.
5. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que lesdits fragments, à l'équilibre, renferment entre 1,5 et 20 % en masse de matière sèche, avantageusement entre 5 et 15 % en masse.
6. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle renferme de 10 à 200 mg/ml, avantageusement de 20 à 150 mg/ml, desdits fragments en suspension dans ladite phase continue.
7. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite phase continue présente une viscosité intrinsèque entre 1 500 et 3 200 ml/g.
8. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ladite phase continue est une solution aqueuse dudit polymère dont la masse moléculaire est supérieure ou égale à 1 million de Daltons, avantageusement comprise entre 1 et 3 millions de Daltons et qui a éventuellement été réticulé, via les fonctions hydroxyles dudit polymère, au moyen d'un agent

réticulant, dans un rapport : nombre total de fonctions réactives dudit agent réticulant / nombre total de motifs disaccharidiques des molécules du polymère présentes compris entre 0,01 et 0,4.

5 9. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la phase dispersée, ainsi qu'éventuellement la phase continue, a été réticulée avec un polyépoxyde et notamment le 1,4-bis(2,3-époxypropoxy)butane.

10 10. Composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'acide hyaluronique ou son sel, présent dans la suspension, i.e. dans la phase dispersée et éventuellement la phase continue, a été obtenu par voie bactérienne.

11. Procédé de préparation d'une composition biphasique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 15 - la préparation et la purification d'un hydrogel insoluble dudit polymère fortement réticulé,  
- la fragmentation dudit hydrogel par cisaillement,  
- la mise en suspension des fragments dudit hydrogel dans une phase continue adéquate.

20 12. Matériau de comblement utile en chirurgie réparatrice et en chirurgie esthétique caractérisé en ce qu'il est à base d'une composition biphasique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, avant injection et ce que, après injection, sa structure évolue, suite à la résorption de la phase continue, vers celle d'un film stable résultant du regroupement des fragments de la phase dispersée.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61L31/00 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 13755 (COLETICA) 22 July 1993 see page 7, line 31; claims 1,3,15 ---	1-12
Y	EP,A,0 466 300 (BIOMATRIX) 15 January 1992 cited in the application see claims 1,5 -----	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 1996

Date of mailing of the international search report

18.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peltre, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 1, FR 96/00636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9313755	22-07-93	FR-A- 2686250	23-07-93
		AT-T- 136773	15-05-96
		DE-D- 69302262	23-05-96
		EP-A- 0621776	02-11-94
		JP-T- 7503001	30-03-95
-----			
EP-A-466300	15-01-92	US-A- 5143724	01-09-92
		AU-B- 629467	01-10-92
		AU-A- 7405591	09-01-92
		CA-A- 2041074	10-01-92
		JP-A- 4261664	17-09-92
		JP-B- 7093943	11-10-95
		US-A- 5399351	21-03-95
		US-A- 5246698	21-09-93
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PC., FR 96/00636

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 A61L31/00 A61L27/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 13755 (COLETICA) 22 Juillet 1993 voir page 7, ligne 31; revendications 1,3,15	1-12
Y	EP,A,0 466 300 (BIOMATRIX) 15 Janvier 1992 cité dans la demande voir revendications 1,5	1-12

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \* "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \* "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \* "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \* "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \* "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \* "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \* "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \* "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Peltre, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Demande Internationale No

PC 1, FR 96/00636

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9313755	22-07-93	FR-A- 2686250	23-07-93
		AT-T- 136773	15-05-96
		DE-D- 69302262	23-05-96
		EP-A- 0621776	02-11-94
		JP-T- 7503001	30-03-95
-----			
EP-A-466300	15-01-92	US-A- 5143724	01-09-92
		AU-B- 629467	01-10-92
		AU-A- 7405591	09-01-92
		CA-A- 2041074	10-01-92
		JP-A- 4261664	17-09-92
		JP-B- 7093943	11-10-95
		US-A- 5399351	21-03-95
		US-A- 5246698	21-09-93
-----			